Über die NO_2- und NO_3-Fixation des Azotobakters nebst einer Untersuchung über die Bestimmung von NH_2OH, NO_2', NO_3' und J_2.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt
von
Liese K a u f m a n n
aus Würzburg

April 1938.

Berichterstatter: Geheimrat Prof. Dr. H. Wieland
Tag der mündlichen Prüfung: 2.Juni 1938.

Sonderabdruck aus Hoppe-Seyler's Ztschr. f. physiolog. Chem. 243. Bd. (1936).

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Eine neue Methode zur Mikrobestimmung von Jod und Jodiden.

Von

Günther Endres und **Liese Kaufmann.**

Mit 1 Figur im Text.

(Aus dem Chem. Laboratorium der Bayer. Akad. der Wissenschaften in München.
(Der Schriftleitung zugegangen am 21. Juli 1936.)

Die vorliegende Untersuchung über die Bestimmung kleinster Mengen Jod steht in engem Zusammenhang mit unseren analytischen Ergebnissen über den quantitativen Nachweis sehr geringer Mengen Hydroxylamin, — mit Arbeiten, die wir im Rahmen unserer Untersuchungen über den Mechanismus der bakteriellen Stickstoff-Fixation ausgeführt haben [1]).

Es ist schon lange bekannt, daß Hydroxylamin in der Kälte durch J_2 zu salpetriger Säure oxydiert wird [2]). Wir haben festgestellt, daß die Oxydation des Hydroxylamins durch Jod in Gegenwart von Sulfanilsäure einsinnig nach folgender Gleichung verläuft:

(Gl. 1) $$NH_2OH + 2J_2 + H_2O \longrightarrow HNO_2 + 4HJ$$

Der quantitative Verlauf der Reaktion zeigt, daß die salpetrige Säure viel rascher mit der Sulfanilsäure reagiert als mit dem noch unverbrauchten NH_2OH unter Bildung von N_2O, bzw. mit den anwesenden J' unter Entwicklung von NO. Die entstandene Diazoverbindung, deren Menge dem gesuchten NH_2OH-Gehalt äquivalent ist, wird mit α-Naphthylamin gekuppelt und die Konzentration des Azofarbstoffes durch Photometrieren bestimmt. Auf diese Weise können noch 0,07 γ NH_2OH—N in 10 ccm Lösung — das entspricht einer NH_2OH-Konzentration von $5 \cdot 10^{-7}$ Mol/Liter — auf 2—3 % genau bestimmt werden.

Es lag nun nahe, zu versuchen, dasselbe Prinzip für eine Jodbestimmung nutzbar zu machen, das heißt, *kleine Mengen Jod mit einem Überschuß von Hydroxylamin in Gegenwart von Sulfanilsäure zu reduzieren und das nach Gleichung 1 entstandene Nitrit bzw. Diazoniumsalz zu analysieren.* Die Versuche ergaben, daß sich auf diesem Wege eine genaue und bequeme Mikro-Jodbestimmung durchführen läßt.

[1]) Liebigs Ann. **512**, 54 (1934); **518**, 109 (1935).

[2]) Blom war der erste, der diese Reaktion zum qualitativen Nachweis von NH_2OH vorschlug und benützte. Ber. chem. Ges. **59**, 121 (1926).

Bestimmung kleinster Mengen Jod.

Für die Gehaltsbestimmung einer wäßrigen Jodlösung, deren Normalität 10^{-5} bis 10^{-4} betragen soll, ist es zweckmäßig, zu 6 ccm der Lösung 2 ccm einer Hydroxylamin-Sulfanilsäurelösung zu geben — wir bezeichnen diese Lösung kurz als Reagenzlösung — und nach 10 Minuten Wartezeit mit 1 ccm Naphthylaminlösung zu kuppeln. Die Lösung färbt sich rot. Das nach Gleichung 1 entstandene Nitrit reagiert sofort mit der Sulfanilsäure und löst in Gegenwart von Naphthylamin die Farbstoffbildung aus. Ein Maß für die Menge des ursprünglich vorhandenen Jods ist die Intensität der Färbung, die jeweilige Konzentration des Azofarbstoffes, die sich durch Extinktionsmessung leicht feststellen läßt. Die Temperatur der Lösung soll 20° nicht übersteigen. Da die Bildung des Azofarbstoffes mit meßbarer Geschwindigkeit verläuft, darf erst nach 10—15 Minuten Reaktionsdauer die Extinktion der Lösung ermittelt werden. Die Reagenzlösung ist n/10 an Hydroxylamin, n/35 an Sulfanilsäure und enthält pro 10 ccm 2 ccm Eisessig.

Die Konzentration des Azofarbstoffes wurde mit Hilfe des Pulfrich-Photometers von Zeiss bestimmt. Das Lambert-Beersche Gesetz ist für Lösungen des roten Farbstoffes (Benzolsulfonsäure 1-4 azo 4-naphthylamin 1) unter den angewandten Bedingungen erfüllt. Die Extinktion ist gemäß der Gleichung $\lg \frac{J_0}{J} = K c d$ eine lineare Funktion der Farbstoffkonzentration. Für eine Schichtdecke von 3 cm und einen Farbstoffgehalt von 10^{-5} Mol/Liter beträgt bei Verwendung des grünen Filters S_{53} die Extinktion 1,16. Hieraus berechnet sich der Faktor, mit dem man die abgelesene Extinktion multiplizieren muß, um den Jodgehalt in γ zu erhalten, bei einem Gesamtvolumen von 10 ccm und Gültigkeit der Gleichung 1 zu 43,8. In der Tab. 1 sind die Ergebnisse einer Versuchsreihe angeführt:

Tabelle 1.

ccm 10^{-4} n-Jodlösung	0,4	0,8	1,0	2,0	3.0	4,0
ccm H_2O	6,6	6,2	6,0	5,0	4,0	3,0
ccm Reagenslösung	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
ccm Naphthylaminlösung	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Extinktion	0,115	0,23	0,29	0,57	0,86	1,13
γ Jod theoretisch	5,1	10,2	12,7	25,4	38,1	50,8
γ Jod gefunden	5,0	10,1	12,7	25,0	37,6	49,5

Die Fehlergrenze dieser absoluten Bestimmungsmethode beträgt etwa 2 %.

Bestimmung kleinster Mengen Jodionen.

Das übliche Mikrobestimmungsverfahren für Jodid nach Winkler beruht auf der Oxydation der Jodionen zu Jodsäure durch Bromwasser, dessen Überschuß durch Kochen entfernt wird. Nach Zugabe von 3 Tropfen einer 10%igen KJ-Lösung bildet sich die 6fach größere Menge — verglichen mit der ursprünglichen — freies Jod, welche mit Thiosulfat titriert wird.

Versucht man das nach Winkler durch Umsatz von Jodsäure mit überschüssigen Jodionen erhaltene Jod nach der Hydroxylamin-Sulfanilsäure-Methode zu bestimmen, so erhält man keine befriedigenden Resultate. Die Störung wird durch den relativ hohen KJ-Gehalt der Lösung, d. h. durch das Auftreten von J_3', verursacht. Der Weg, mit dem mehr als 100fachen Überschuß von KJ (bezogen auf Jodat) stark herunterzugehen, ist nicht gangbar, da unter diesen Bedingungen die Bildung des freien Jodes viel zu langsam verläuft. Es ist deshalb notwendig, das freie Jod durch Destillation von den Jodionen zu trennen, eine Aufgabe, die mit Hilfe einer geeigneten Apparatur[1]) zu lösen ist.

Die Gehaltsbestimmung wechselnder Mengen einer 10^{-5} n-KJ-Lösung haben wir — unter Berücksichtigung der exakten Angaben von J. F. Reith[2]) über das Winklersche Oxydationsverfahren — im Prinzip auf folgende Weise ausgeführt[1]): Die Analysenlösung, die 1—10 γ Jodionen enthält, wird in einen Mikroschliffkolben einpipettiert und nach Zugabe von Eisessig und Bromwasser auf dem Sandbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wird die Jodsäure-haltige Lösung mit einem Überschuß von Kalium-

Tabelle 2.

ccm 10^{-5} KJ-Lösung	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	10,0
γ Jod theoretisch	0,64	$1,2_7$	$2,5_4$	$3,8_1$	$5,0_3$	$6,3_5$	12,7
γ Jod gefunden.	$0,7_7$	$1,3_2$	$2,6_3$	$3,7_6$	$4,8_2$	$6,3_5$	12,4
desgl.	$0,7_1$	$1,2_6$	$2,6_3$	$3,7_6$	$5,0_3$	$6,3_0$	12,6
desgl.	$0,7_1$	$1,3_2$	$2,5_2$	$3,8_2$	$4,9_2$	$6,3_5$	12,7

jodid versetzt und das entstandene Jod abdestilliert. Als Vorlage dient ein Mikro-Peligotrohr, das mit 5 ccm n/100 Natronlauge beschickt ist. Durch Zugabe von 1 ccm Eisessig und 2 ccm Reagenzlösung in die Vorlage wird das Jod in Freiheit gesetzt und reduziert. Schließlich wird die entstandene Diazoverbindung mit

[1]) Näheres vgl. Versuchsteil.
[2]) Biochem. Z. 216, 249 (1929).

α-Naphthylamin gekuppelt und die Extinktion der Lösung gemessen. Einige Analysenergebnisse dieser Methode sind in der Tab. 2 zusammengestellt.

Zur Berechnung des Jodgehaltes in γ ist die abgelesene Extinktion für 10 (15) ccm Gesamtvolumen und 3 cm Schichtdicke mit dem Faktor 7,3 ($10{,}9_5$) zu multiplizieren[1]). Die gefundenen Werte stimmen untereinander auf etwa 4% überein. Stellt man den Blindwert (Spuren von Nitrit) und eine kleine Korrektionsgröße in Rechnung, dann lassen sich die Abweichungen vom theoretischen Wert, die mit abnehmendem Jodidgehalt naturgemäß größer werden, sicherlich noch vermindern. Für die Beantwortung der meisten physiologischen Jodfragen dürfte die Empfindlichkeit der Methode — die sich steigern läßt, wenn man die Farbstofflösung im Vakuum bei 20° einengt und die Extinktion mit Hilfe einer Mikroküvette ($d = 5$ cm; $v = 1$ ccm) ermittelt — ausreichend sein. Das Hydroxylamin–Sulfanilsäure-Verfahren eignet sich für Serienanalysen. Es ist jedoch nur für Bestimmungen kleinster Mengen Jod brauchbar, da die Konzentration des Azofarbstoffes, der schwerlöslich ist, zweckmäßig nicht mehr als $2 \cdot 10^{-5}$ Mol/Liter betragen soll.

Zusammenfassung. Reduziert man in wäßriger, schwach essigsaurer Lösung molekulares Jod mit einem Überschuß von Hydroxylamin, so erhält man in Gegenwart von Sulfanilsäure, die die gebildete salpetrige Säure abfängt, die äquivalente Menge Diazoniumsalz. Dieses wird mit α-Naphthylamin gekuppelt und die Konzentration des roten Azofarbstoffes durch Extinktionsmessung ermittelt.

Zum Schluß sei bemerkt, daß das hier für eine Jodbestimmung ausgewertete Prinzip — Mikromengen oxydierender Substanzen dadurch zu bestimmen, daß man sie mit Hydroxylamin in Gegenwart von Sulfanilsäure umsetzt und das entstandene Nitrit bzw. Diazoniumsalz analysiert — allgemeinerer Anwendung fähig ist, was gelegentlich an einigen Beispielen gezeigt werden soll.

Versuchsteil.

Angewandte Lösungen. I. n/1-Hydroxylamin-Lösung. 16,4 g $(NH_2OH)_2 \cdot H_2SO_4$ p. A. werden in H_2O gelöst. Gesamtvolumen 100 ccm.

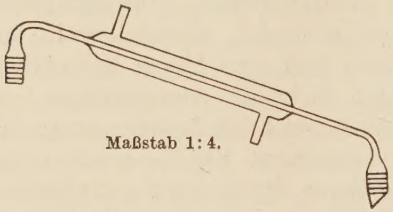
II. n/25-Sulfanilsäure-Lösung. 0,9 g Sulfanilsäure p. A. (Merck) werden in 105 ccm H_2O gelöst (Erwärmen).

---

[1]) Dem Faktor liegen Extinktionsmessungen von Nitrit- bzw. Farbstofflösungen bekannten Gehaltes zu Grunde.

III. Reagenz-Lösung. Zur Herstellung dieser Lösung gibt man zu 105 ccm frisch bereiteter Lösung II 15 ccm Lösung I und 30 ccm reinsten (NO_2-freien) Eisessig. 2 ccm Lösung III dürfen sich auf Zusatz von 2 ccm Lösung IV nicht verfärben.

IV. Naphthylamin-Lösung. 500 ccm kochendes destilliertes Wasser werden mit etwa 3 g α-Naphthylamin p. A. (Merck) versetzt und einige Minuten im Sieden erhalten. Die heiße Lösung wird filtriert und durch Zusatz von 25 ccm reinstem Eisessig vervollständigt. Die Lösung ist begrenzt haltbar und in brauner Flasche aufzubewahren.


Maßstab 1:4.

Angewandte Apparatur. Der Destillationsaufsatz besteht aus einem zweifach gebogenen Glasrohr mit Kühler und 2 Normalschliffen (innere Weite 1 cm). Vgl. vorstehende Figur. Als Destillationsgefäß haben wir einen Mikro-Normalschliffkolben (20 ccm) nach Neumann, als Vorlage ein kleines Peligot-Rohr mit Schliff (Kugeldurchmesser 2 cm) benutzt.

Bestimmung des Jodgehaltes von 1 ccm einer 10^{-5} n-KJ-Lösung nach dem Hydroxylamin-Sulfanilsäure-Verfahren.

In einen 20 ccm fassenden Mikroschliffkolben aus Jenaer Glas werden 1 ccm 10^{-5} n-KJ-Lösung einpipettiert und etwa 4 ccm Wasser und 0,1 ccm reinster Eisessig hinzugegeben. Das Volumen soll vor der Brom-Oxydation 4—5 ccm betragen. Nach Zusatz von 3 Tropfen frisch bereitetem Bromwasser wird die Lösung auf dem Sandbad im schräg gestellten Kölbchen erhitzt und unter Verwendung einer Siedekapillare 1 Minute in kräftigem Kochen erhalten. Hierauf wird die Lösung gut gekühlt und mit 3 Tropfen einer n/10-KJ-Lösung versetzt. Das Kölbchen samt Kapillare schließt man sofort an die Destillationsapparatur an, deren Vorlage mit 5 ccm (evtl. nur mit 3—4 ccm je nach Größe) n/100-NaOH beschickt und mit Wasser (10—15°) gekühlt ist. Nach 2 Minuten lebhaften Siedens ist die Destillation beendet. In das Peligot-Rohr gibt man nun 1 ccm Eisessig, um das Jod frei zu machen, und 2 ccm Reagenz-Lösung (durchmischen), läßt dann 8—10 Minuten stehen und kuppelt durch Zugabe von 1 ccm Naphthylamin-Lösung. Nach einer Wartezeit von 15 Minuten wird die rosa gefärbte Lösung, deren Volumen durch Zugabe von Wasser auf 15,0 ccm (evtl. 10,0 ccm) gebracht ist, in eine Küvette (d = 3 cm) eingefüllt und die Extinktion gemessen. Filter S_{53}. Als Vergleichslösung dient, um die schwache Trübung der Naphthylamin-Lösung zu kompensieren, eine Mischung von 1 ccm Naphthylamin-Lösung mit 14 ccm Wasser. Extinktion (Mittelwert) 0,12. Daraus berechnet sich der Jodgehalt zu: $0{,}12 \cdot 10{,}95 = 1{,}32\,\gamma$ Jod (theoretisch 1,27 γ).

Sonderabdruck aus Liebigs Annalen der Chemie 530. Band (1937).

Die Bestimmung kleinster Mengen von Hydroxylamin, Nitrit und Nitrat;

von *Günther Endres* und *Liese Kaufmann.*

Mit 1 Figur im Text.

[Aus dem Chemischen Laboratorium der Bayer. Akademie der Wissenschaften zu München.]

(Eingelaufen am 2. Juni 1937.)

Im Verlauf unserer Untersuchungen[1]) über den Mechanismus der N_2-Bindung durch Azotobakter haben wir Methoden ausgearbeitet, die es erlauben, Hydroxylamin, Nitrit und Nitrat in kleinsten Mengen nebeneinander nachzuweisen und quantitativ zu erfassen.

Mikromethoden, die solche Aufgabe lösen, sind von biologischem Interesse, da sie Einblick in den Stickstoff-Kreislauf der Natur vermitteln können.

Von analytischen Verfahren, welche zum Nachweis physiologischer Zwischenprodukte dienen sollen, ist vor allem eine große Empfindlichkeit zu verlangen, der Fehlergrenze nur geringere Bedeutung beizumessen. Wir haben eine Vorschrift dann als brauchbar erachtet, wenn sie 0,0014 mg N in 10 ccm Lösung (10^{-5} Mol/Liter) mit einer Fehlergrenze von 5—10 Proc. quantitativ zu bestimmen erlaubt. Sämtliche Analysen sind, um die Methoden etwas den praktischen Verhältnissen, d. h. den Kulturbedingungen der Mikroorganismen anzugleichen, mit nur 10 ccm Lösung ausgeführt worden, deren p_H 7,2 ($^m/_{50}$-Phosphat) betrug.

Nitrit-Analyse. Der Nitritgehalt wurde nach der üblichen Gries-Ilosvay-Methode mit Hilfe des Pulfrich-Photometers bestimmt.

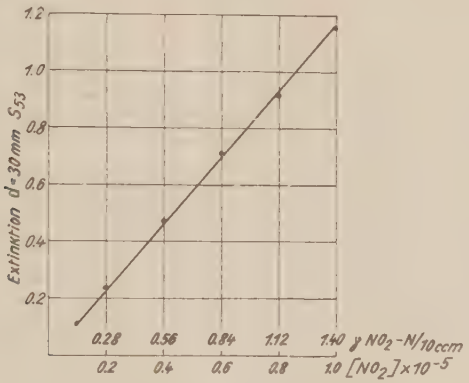
Es ist zweckmäßig, zu 10 ccm Nitrit-Lösung 2 ccm Sulfanil-Essigsäure und 2 ccm Naphtylamin[2]) hinzuzufügen. Nach 10—15 Minuten Reaktionsdauer ist die Konzentration des entstandenen Azofarbstoffes

[1]) A. **512**, 54 (1934); **518**, 109 (1935).

[2]) Näheres im Versuchsteil.

(Benzolsulfonsäure-1,4-azo-4-naphtylamin-1) dem ursprünglich vorhandenen Nitritgehalt äquivalent. Die Intensität der Färbung wird durch Extinktionsmessung festgestellt. Wie die Figur zeigt, ist das Lambert-Beersche Gesetz unter den angewandten Bedingungen erfüllt. Die Extinktion ist gemäß der Gleichung $\log J_0/s = k\,c\,d$ eine lineare Funktion des Farbstoff- bzw. Nitrit-Gehaltes der Lösung. Für eine Schichtdicke von $d = 3$ cm und einer Nitrit-Konzentration von 10^{-5} Mol/Liter (= 1,4 γ NO_2–N 10 ccm) beträgt bei Verwendung des grünen Filters S 53 die Extinktion 1,16.

Der Faktor, mit dem die jeweils abgelesene Extinktion zu multiplizieren ist, um den Gehalt an NO_2–N in γ pro 10 ccm zu erhalten



— dieses Maß hat sich für unsere Untersuchungen als zweckmäßig erwiesen —, berechnet sich zu 1,21. Von Nitrit-Lösungen mit einem Gehalt über 2,8 γ NO_2–N/10 ccm wird nur ein aliquoter Teil zur Analyse verwandt, da die Konzentration des Azo-Farbstoffes, der schwer löslich ist, nicht mehr als 2.10^{-5} Mol/Liter betragen soll. Die Anwesenheit von Hydroxylamin oder Nitrat ist auf das Analysenergebnis ohne Einfluß.

Hydroxylamin-Analyse. Es ist schon lange bekannt, daß Hydroxylamin in essigsaurer Lösung durch Jod teilweise zu salpetriger Säure oxydiert wird. Wir haben durch quantitative Untersuchungen festgestellt, daß in Gegenwart von Sulfanilsäure diese Oxydation nach folgender Gleichung zur äquivalenten Menge Diazoniumsalz führt ($R = C_6H_4$–SO_3H):

$$\text{I}\quad NH_2OH + 2\,J_2 + 2H_2O \longrightarrow HNO_2 + 4HJ,$$
$$\text{II}\quad HNO_2 + RNH_2 \longrightarrow RN_2OH + H_2O.$$

Diese Reaktion gestattet eine quantitative Hydroxylamin-Bestimmung. Kuppelt man in üblicher Weise das Diazoniumsalz mit Naphtylamin, so ist die Konzentration des gebildeten Azo-Farbstoffes ein Maß für die ursprünglich vorhandene Hydroxylaminmenge. Die Hydroxylamin-Analyse läuft also nach der Jodoxydation auf eine quantitative Nitritbestimmung hinaus. In der Tab. 1 sind die Ergebnisse einer Versuchsreihe zusammengestellt:

Tabelle 1.

$[NH_2OH].10^{-6}$	1	2	4	6	8	10	15	20
Extinktion (v = 14,3 ccm)	0,086	0,17	0,32	0,47	0,60	0,77	1,26	1,63
γ NH_2OH–N/10 ccm theor.	0,14	0,28	0,56	0,84	1,12	1,40	2,1	2,8
γ NH_2OH–N/10 ccm gef. .	0,15	0,29	0,56	0,82	1,05	1,33	2,2	2,82

Zur Berechnung des Hydroxylamingehaltes in γ NH_2OH–N/10 ccm ist die abgelesene Extinktion bei 3 cm Schichtdicke und Filter S 53 mit dem Faktor 1,21 zu multiplizieren. Wie aus den angeführten Analysen hervorgeht, lassen sich noch 0,1—0,2 γ NH_2OH–N in 10 ccm Lösung bestimmen. Diese quantitative Methode gehört zu den empfindlichsten der analytischen Chemie. Die Fehlergrenze beträgt 2—3 Proc.

Hydroxylamin-Nitrit-Analyse. 1. Die Analyse von Lösungen, die Hydroxylamin-Nitrit enthalten, ist einfach, wenn die Konzentration des Hydroxylamins mindestens 10 Proc. der Nitrit-Konzentration beträgt. In diesem Falle verfährt man folgendermaßen:

Ein aliquoter Teil der Analysenlösung wird mit Sulfanilsäure und Naphtylamin versetzt und in üblicher Weise die Extinktion E_1 und damit der Nitritgehalt bestimmt. Ein zweiter aliquoter Teil der Lösung wird nach dem im vorigen Abschnitt beschriebenen Verfahren mit Jod in Gegenwart von Sulfanilsäure oxydiert. Mit der Sulfanilsäure reagiert jetzt sowohl das ursprünglich vorhandene als auch das durch die J_2-Oxydation gebildete Nitrit. Hieraus folgt, da die Menge des Diazoniumsalzes bzw. Azo-Farbstoffes der Summe der Nitrit- und Hydroxylamin-Konzentration entspricht, daß die Extinktion (E_2 der Tab. 2)

dieser Probe — vermindert um E_1 — dem gesuchten Hydroxylamin-Gehalt proportional ist. Einige analytische Ergebnisse, die mit dieser Methode erhalten wurden, gibt die Tab. 2 wieder.

Tabelle 2.

γ HNO_2–N/10 ccm theor.	1,4	0,14	0,70	0,28	1,4
γ NH_2OH–N/10 ccm theor..	0,14	1,4	0,28	0,70	1,4
E_1 ($v = 15$ ccm).	0,80	0,10	0,41	0,18	0,79
E_2 ($v = 15$ ccm).	0,89	0,90	0,56	0,53	1,55
γ HNO_2–N/10 ccm gef.	1,46	0,18	0,75	0,32	1,44
γ NH_2OH–N/10 ccm gef..	0,16	1,45	0,27	0,63	1,38

Die Differenz $E_2 - E_1$ (vgl. Tab. 2) muß — will man nicht die Versuchsfehler zu groß werden lassen — mindestens 0,1 betragen. Aus diesem Grunde ist die beschriebene Methode nur dann brauchbar, wenn der NH_2OH-Gehalt mindestens den zehnten Teil des Nitritgehaltes ausmacht.

Soll lediglich der NH_2OH-Gehalt ermittelt werden, dann ist es vorteilhaft, direkt die Farbintensität der beiden Analysen im Stufenphotometer zu vergleichen. Konzentriertere Nitrit-Hydroxylamin-Lösungen sind auf eine Gesamt-Stickstoff-Konzentration von etwa $2 \cdot 10^{-5}$ Mol/Liter zu verdünnen.

2. Für die Durchführung von NH_2OH-Analysen, welche mehr als den 10-fachen Überschuß Nitrit enthalten[1]), ist es notwendig, die salpetrige Säure zu entfernen. Diese Aufgabe erfordert eine spezielle Lösung. Alle üblichen Methoden, Nitrit zu beseitigen — sei es mit Ammoniumchlorid oder Harnstoff oder Azid — sind unbrauchbar. Diese Verbindungen reagieren nämlich mit der salpetrigen Säure nur bei einem p_H unter 4 und nur in der Hitze mit erwünschter Geschwindigkeit. Unter solchen Bedingungen jedoch setzt sich bekanntlich Hydroxylamin mit Nitrit um und wird unter Bildung von N_2O zerstört. Eine Lösung, die z. B. 2,8 γ HNO_2–N und 2,8 γ NH_2OH–N in 10 ccm enthält, erleidet durch 3 Minuten langes Kochen bei p_H 4 einen NH_2OH-Verlust von etwa 40 Proc.

Wir haben gefunden, daß sich diese Schwierigkeiten vermeiden lassen, wenn man zuerst die salpetrige Säure

[1]) Studien über die Nitrit-Assimilation der Zelle erfordern solche Analysen.

mit Sulfanilsäure umsetzt und dann das Reaktionsprodukt, das entstandene Diazoniumsalz, welches unter den angewandten Bedingungen nicht mehr mit NH_2OH reagiert, mit Natriumazid beseitigt. Dieser neue Weg ergab sich aus folgender Beobachtung: Gibt man zu einer wäßrigen Diazoniumsalz-Lösung äquivalente Mengen Azid, so ist nach einiger Zeit diese Verbindung zerstört. Offenbar reagiert die Stickstoffwasserstoffsäure mit dem Diazoniumsalz unter Bildung von 4 Azido-benzolsulfonsäure gemäß der Gleichung:

$$\text{III} \quad RN_2OH + N_3H \longrightarrow RN_3 + N_2 + H_2O\,.$$

Die Geschwindigkeit dieser Reaktion ist um so größer, je saurer die Lösung ist. Die Tab. 3 erlaubt, die Wirkung von Azid bei p_H 3 und 4 auf *gleiche* Mengen Nitrit und Diazoniumsalz zu vergleichen. Die Zahlen geben die Menge des zerstörten Nitrits bzw. Diazoniumsalzes in Proc. an.

Tabelle 3.

[Nitrit]	10^{-5}		10^{-5}	
[Sulfanilsäure]	—		10^{-2}	
[Azid]	10^{-5}		10^{-5}	
p_H	4	3	4	3
3′	—	—	15	45
10′	—	—	30	65
30′	—	—	55	90
60′	10	30	85	100

Es geht aus diesen Versuchen hervor, daß bei p_H 4 die Einwirkung von Azid während 60 Minuten auf salpetrige Säure nur einen HNO_2-Verlust von 10 Proc. zur Folge hat, während unter den gleichen Bedingungen 85 Proc. Diazoniumsalz zerstört werden.

Läßt man statt bei Zimmertemperatur die Reaktion III bei 100° vor sich gehen, dann ist nach 3 Minuten Kochdauer in der Lösung kein Diazoniumsalz mehr durch Zugabe von Naphtylamin nachzuweisen.

Diese Ergebnisse führen zu folgender Vorschrift: Für eine Hydroxylamin-Bestimmung neben größeren Mengen Nitrit gibt man zu 10 ccm der Lösung die dem Nitrit entsprechende Menge Natriumazid hinzu und bringt durch

Zugabe von $^n/_{25}$-Sulfanilsäure das p_H auf 4. Die Lösung wird nun 3 Minuten gekocht, um sie nitritfrei zu machen, und nach dem Erkalten der NH_2OH-Gehalt in üblicher Weise bestimmt. Die jeweilige Nitritkonzentration wird durch eine gesonderte Probe ermittelt. Einige Ergebnisse sind in der Tab. 4 zusammengefaßt:

Tabelle 4.

Versuch-Nummer	1	2	3	4
γ HNO_2–N/10 ccm theor.	7,0	35	70	140
γ NH_2OH–N/10 ccm theor.	1,4	1,4	1,4	1,4
E_{NH_2OH} (v = 20 ccm)	0,58	0,54	0,51	0,55
NH_2OH–N/10 ccm gef.	1,4	1,3	1,2	1,3

Die Resultate sind befriedigend. Die Beseitigung des Nitrits erfolgt ohne größeren Hydroxylamin-Verlust. Wie aus dem Versuch 4 der Tab. 4 hervorgeht, lassen sich noch nach Zerstörung von 140 γ NO_2–N (KNO_2-Konzentration $= {}^n/_{1000}$) die vorhandenen 1,4 γ NH_2OH mit etwa 10 Proc. Genauigkeit quantitativ ermitteln.

Die zugesetzte Menge Azid soll dem vorhandenen Diazoniumsalz äquivalent sein. Ein kleiner Überschuß an Azid ist ohne Schaden, da diese geringen nicht verbrauchten Mengen N_3H durch das Kochen der Lösung entfernt werden. Auch ein Unterschuß von Azid bleibt auf das Analysenergebnis ohne Einfluß, da die restlichen, nicht umgesetzten Diazoniummengen glatt verkocht werden.

Erwähnt sei, daß diese einfache Methode, Diazoniumsalz zu zerstören, nur dann brauchbar ist, wenn in der Lösung weniger als 5 γ HNO_2–N/10 ccm vorhanden sind. Ist die Diazoniumsalz-Konzentration größer als 4.10^{-5} Mol/Liter, so wird die Lösung beim Verkochen infolge der Phenolbildung gelbbraun. Sie absorbiert jetzt beträchtlich im grün (Filter S 53) und stört die Extinktionsmessungen zur quantitativen Bestimmung des Hydroxylamins bzw. Azofarbstoffes. Bei kleinen Nitritmengen (unter 4.10^{-5} Mol/Liter) bleibt die Verfärbung aus.

3. Das Azid-Verfahren zur Entfernung größerer Mengen Nitrit läßt sich modifizieren. Statt in der Hitze die Diazoverbindung umzusetzen, kann man auch bei Zimmertemperatur mit Azid-Unterschuß arbeiten. Man gibt in diesem

Fall etwa 10 Proc. weniger Azid hinzu, als es das stöchiometrische Verhältnis erfordert, und versetzt die Lösung bis zu einem p_H von 3 mit Eisessig. Der größte Teil des Diazoniumsalzes ist nach 30 Minuten zerstört (vgl. Tab. 3). Der Restgehalt ist jetzt von ähnlicher Größenordnung wie der des Hydroxylamins, was zur Folge hat, daß nun der Hydroxylamingehalt nach der unter 1 beschriebenen Methode bestimmt werden kann. Die zu analysierende Lösung wird in 2 Teile geteilt und die noch vorhandene Nitritkonzentration in der einen, die Summe der Nitrit- und Hydroxylaminkonzentration in der anderen Lösung ermittelt. Einige Ergebnisse bringt die Tab. 5.

Tabelle 5.

γ NO_2–N/10 ccm theor. . . .	38,5	77	161
γ NH_2OH–N/10 ccm theor. .	1,4	1,4	1,4
Zugabe: γ Azid/3–N/10 ccm .	35	70	140
γ NH_2OH–N/10 ccm gef. . .	1,4	1,3	1,5

Dieses nicht ganz einfache Verfahren vermeidet das Kochen in schwach saurer Lösung, eine Operation, die zu einer Verseifung eventuell vorhandener Oxime und dadurch zu falschen Werten für freies Hydroxylamin führen kann.

Hydroxylamin-Nitrit-Nitrat-Analyse. Wir haben die Bestimmung des Nitrat-Stickstoffes nach der bekannten Brucin-Methode unter Berücksichtigung der Angaben von C. Urbach[1]) ausgeführt. In stark schwefelsaurer Lösung reagiert Salpetersäure mit Brucin unter Bildung von Kakothelin, eines Orthochinons, das gelb gefärbt ist. Die Intensität der Färbung ist bei genauem Einhalten gleicher Versuchsbedingungen der ursprünglichen Nitrat-Konzentration proportional und im Stufenphotometer leicht zu messen. Das Lambert-Beersche Gesetz ist erfüllt. Verglichen mit der Nitrit- oder Hydroxylamin-Methode ist die Nitratbestimmung wesentlich unempfindlicher. Die Farbtiefe der gelben Lösungen nimmt mit steigendem Nitratgehalt nur langsam

[1]) Mikrochemie **10**, 483 (1931).

zu. Unter Verwendung des violetten Filters S 43 lassen sich bei 3 cm Schichtdicke 2—14 γ NO_3–N in 5 ccm erfassen.

Zur Nitratbestimmung versetzt man 5 ccm der Lösung mit 1 ccm Brucin-Schwefelsäure und dann tropfenweise mit 10 ccm konz. Schwefelsäure. Nach $^1/_2$—1 Stunde wird die Extinktion der gelben Lösung im Stufenphotometer gemessen. Das Gesamtvolumen beträgt 16 ccm. Um aus der abgelesenen Extinktion (S 43; d = 3 cm) den Nitratgehalt in γ N der angewandten 5 ccm Lösung zu erhalten, ist die Extinktion mit dem Faktor 8,7 zu multiplizieren. Dieser Konstanten liegen Analysen von abgestuften Mengen einer Nitratlösung bekannten Gehaltes zugrunde.

Bei Gegenwart von biologischen Substraten ist darauf zu achten, daß die Konzentration z. B. von Glucose oder Lactat kleiner als $^n/_{100}$ ist. Höhere Konzentrationen üben einen störenden Einfluß auf die Nitratbestimmungen aus.

Enthält die Analysenlösung erhebliche Mengen Nitrit, so müssen diese vor der Nitratbestimmung entfernt werden. Zu diesem Zweck gibt man zu 10 ccm der Lösung 0,2 ccm konz. H_2SO_4 und etwas mehr als die dem Nitrit entsprechende Menge Azid hinzu. Man kocht etwa 3 Minuten und bestimmt in einem aliquoten Teil (5 ccm) der Lösung den Nitratgehalt.

Zum Schluß sei die Brauchbarkeit der beschriebenen Verfahren durch die Wiedergabe der analytischen Ergebnisse zweier Gesamtanalysen (Tab. 6) dargetan:

Tabelle 6.

Versuch	1	2
γ KNO_3–N/10 ccm theor. . .	27,5	27,5
γ KNO_2–N/10 ccm theor. . .	0,28	2,76
γ NH_2OH–N/10 ccm theor. .	0,26	0,26
γ KNO_3–N/10 ccm gef. . . .	27,8	28,4
γ KNO_2–N/10 ccm gef. . . .	0,32	2,84
γ NH_2OH–N/10 ccm gef. . .	0,26	0,28

Eine Gesamtanalyse der 3 N-Verbindungen: Nitrat, Nitrit und Hydroxylamin zerfällt in 3 Einzelbestimmungen. Für die Durchführung der Analysen werden etwa 10 bis 20 ccm benötigt. Der Nitrit- und Hydroxylamingehalt soll

mindestens 0,3 γ N/10 ccm, der Nitratgehalt mindestens 4 γ N/10 ccm betragen.

Es ist offensichtlich, daß die Ausführung solcher Mikro-Analysen, deren Stickstoffkonzentrationen sich zwischen 10^{-5} und 10^{-6} Mol/Liter bewegen, große Sorgfalt und Sauberkeit erfordern. Stets ist es notwendig, zahlreiche Blindproben auszuführen und die Reinheit der Reagentien und Lösungen zu überwachen. Analysiert man Flüssigkeiten biologischen Ursprungs, so sind die optimalen Bedingungen durch Kontrollanalysen zu ermitteln. Es sind alle Störungen auszuschalten, die durch Pufferung der Lösungen oder durch Anwesenheit organischer Substanzen verursacht werden können. Die mitgeteilten Vorschriften stellen für die analytische Bearbeitung biochemischer Probleme nur ein Schema dar, sie zeigen nur den Weg zu dem Ziel: *Ein Hundertstel bis ein Tausendstel Milligramm Hydroxylamin, Nitrit und Nitrat in 10 ccm Lösung quantitativ zu erfassen.*

Versuchsteil.

Angewandte Lösungen.

a) *Sulfanil-Essigsäure-Lösung.* 5,25 g Sulfanilsäure pro analysi werden in 400 ccm warmen destilliertem Wasser unter Zusatz von 100 ccm reinstem nitritfreien Eisessig gelöst.

b) *Naphtylamin-Lösung.* 500 ccm kochendes destilliertes Wasser werden mit etwa 3 g α-Naphtylamin pro analysi versetzt und einige Minuten im Sieden erhalten. Die heiße Lösung wird filtriert und durch Zusatz von 25 ccm reinstem Eisessig vervollständigt. Die Lösung ist begrenzt haltbar und in brauner Flasche aufzubewahren.

5 ccm der Lösung a dürfen sich auf Zusatz von 5 ccm der Lösung b nur spurenweise verfärben.

c) *Jod-Eisessig-Lösung.* 0,65 g Jod pro analysi werden in 100 ccm reinstem Eisessig gelöst.

d) *Thiosulfat-Lösung.* 2,5 g $Na_2S_2O_3$ pro analysi werden in 100 ccm destilliertem Wasser gelöst.

e) *Brucin-Lösung.* 0,2 g Brucin werden in 10 ccm konz. Schwefelsäure (nitratfrei, d = 1,82) gelöst. Dieses Reagens muß täglich frisch bereitet werden.

1. Nitrit-Analyse.

10 ccm der nitrithaltigen Lösung werden mit 2,0 ccm Sulfanil-Essigsäure und 2,0 ccm Naphtylamin versetzt. Nach 10—15 Minuten

Wartezeit wird die Konzentration des roten Azofarbstoffes durch Extinktionsmessung ermittelt. Filter S 53. Für die Küvetten mit 3 cm Schichtdicke werden etwa 12 ccm benötigt.

Bei geringer Rotfärbung wird eine Mischung von 2 ccm Naphtylamin und 12 ccm Wasser für die zweite Küvette zur Kompensation der schwachen Trübung, die die Naphtylamin-Lösung stets besitzt, verwandt. Angenommen, die Extinktion beträgt 0,91 bei einer Schichtdicke von 3 cm und einem Gesamtvolumen von 14,0 ccm, so berechnet sich der Nitritgehalt in γ N 10 ccm zu: 1,21.0,91.1,4 = 1,54. Wird in einem Versuch die Extinktion größer als etwa 1,8 gefunden, dann muß die Analysenlösung entsprechend verdünnt und eine neue Bestimmung ausgeführt werden.

2. *Hydroxylamin-Analyse.*

Zu 10 ccm der NH_2OH-Lösung werden 2,0 ccm Sulfanil–Essigsäure und dann 0,2 ccm Jod–Eisessig gegeben. Nach 10—15 Minuten ist bei Zimmertemperatur die Oxydation beendet. Das unverbrauchte Jod wird mit 2—3 Tropfen Thiosulfat entfernt und die Lösung sofort mit 2,0 ccm Naphtylamin versetzt. Das Gesamtvolumen beträgt 14,3 ccm. Die Intensität der Färbung wird nach 15 Minuten im Stufenphotometer bestimmt. Wird die Extinktion wie z. B. im Versuch Nr. 6 der Tab. 1 zu 0,77 bestimmt, so ergibt die Rechnung, daß in 10 ccm 1,33 γ NH_2OH–N vorhanden sind (1,21.0,77.1,43 = 1,33). Es ist möglich, unter Verwendung von Mikroküvetten (d = 5 cm, v = 1 ccm) mit 1 ccm Lösung für die Extinktionsmessung auszukommen, also noch etwa $^1/_{50}$ γ NH_2OH–N zu ermitteln.

3. *Hydroxylamin-Nitrit-Analyse.*

Die Bestimmung von Hydroxylamin und Nitrit erfolgt stets durch 2 Einzelanalysen. Beträgt der NH_2OH-Gehalt mehr als 10 Proc. des Nitritgehaltes, dann wird nach der auf S. 186 unter 1 im Prinzip beschriebenen Methode verfahren: In 10 ccm wird in üblicher Weise der Nitritgehalt, in weiteren 10 ccm durch Zugabe von Jod die Summe des Nitrit- und Hydroxylamingehaltes bestimmt. Die Durchführung der Analyse erfolgt entsprechend den obigen Angaben 1 und 2. In dem Versuch 3 der Tab. 2 beträgt z. B. die Extinktion E_1, die dem Nitritgehalt proportional ist, bei 15 ccm Gesamtvolumen 0,41. Die Extinktion E_2, die der Summe $NH_2OH + HNO_2$ entspricht, besitzt den Wert 0,56. Hieraus folgt, daß der NH_2OH-Gehalt, für den eine Extinktion (0,56—0,41) von 0,15 in die Rechnung einzusetzen ist, bei einem Gesamtvolumen von 15 ccm 0,27 γ N/10 ccm beträgt. Es ist zweckmäßig, durch einen Vorversuch den ungefähren N-Gehalt zu ermitteln und gegebenenfalls so weit zu verdünnen, daß nicht mehr als 2,8 γ N/10 ccm vorhanden sind.

Bei hoher Nitrit-Konzentration (vgl. S. 187) verfährt man folgendermaßen: 10 ccm der Analyse, deren Nitritgehalt durch eine Vorprobe

bestimmt ist, werden mit der äquivalenten Menge Natrium-azid versetzt. — Da nicht mehr als 1—5 ccm Azid-Lösung verwandt werden sollen, hält man sich zweckmäßig eine Reihe von Lösungen abgestuften Gehaltes vorrätig. 1 ccm einer 10^{-3} n-Azid-Lösung entspricht 14 γ NO_2–N. — Durch Zugabe von $^n/_{25}$-Sulfanilsäure wird ein p_H von 4 eingestellt. Für 10 ccm einer Lösung, deren Phosphatgehalt (p_H 7,2) $^m/_{50}$ ist, sind 4 ccm $^n/_{25}$-Sulfanilsäure erforderlich. Wenn mehr als 100 γ Nitrit-Stickstoff in 10 ccm vorhanden und zu zerstören sind, dann müssen noch 0,1 ccm Eisessig einpipettiert werden, da die Reaktion Wasserstoffionen verbraucht (vgl. Gleichung 3). Der Ansatz wird nun 3 Minuten gekocht und dann rasch abgekühlt. Das Nitrit ist vollständig entfernt (Blindprobe nötig). Der Hydroxylamin-Gehalt wird nun in üblicher Weise bestimmt, indem man 0,2 ccm Jod–Eisessig einpipettiert, nach etwa 10 Minuten das überschüssige Jod durch $Na_2S_2O_3$ beseitigt und schließlich das Diazoniumsalz mit 2,0 ccm Naphtylamin kuppelt. Zum Schluß wird auf 20,0 ccm aufgefüllt und die Extinktion der roten Lösung gemessen.

4. Nitrat-Analyse.

Zu 5 ccm der Analysenlösung gibt man 1 ccm Brucin-Lösung und tropfenweise unter ständigem Umschütteln, zweckmäßig aus einer Bürette, 10,0 ccm nitratfreie konz. Schwefelsäure (d = 1,820—1,825). Die Reaktion gibt sich durch Auftreten einer Rotfärbung, die allmählich in eine Gelbfärbung übergeht, zu erkennen. Man läßt etwa 15 Minuten stehen, kühlt die Lösung ab und mißt ihre Extinktion innerhalb von 60 Minuten unter Verwendung des Filters S 43. Das Gesamtvolumen der Lösung beträgt 16 ccm. Bei einer Extinktion von z. B. 0,62 berechnet sich die Nitratmenge der angewandten 5 ccm bei einer Schichtdicke von 3 cm zu 0,62.8,7 = 5,4 γ NO_3–N. Die Intensität der Gelbfärbung hängt in hohem Maße von der Schwefelsäure-Konzentration ab. Für eine gute Reproduzierbarkeit der Versuche ist ein genaues Einhalten der Bedingungen erforderlich.

Für eine Nitratbestimmung neben Nitrit muß letzteres entfernt werden. 5 ccm der Lösung versetzt man mit 0,2 ccm konz. Schwefelsäure und mit der dem Nitrit äquivalenten Menge Azid. Man kocht 3 Minuten, kühlt ab und füllt die Lösung auf ein bestimmtes Volumen auf. Ein aliquoter Teil, und zwar stets 5,0 ccm, dient nun zur Nitrat-Bestimmung. Hat die Analyse ergeben, daß in den angewandten 5 ccm mehr als 15 γ Nitrat-Stickstoff vorhanden sind, dann ist es notwendig, eine entsprechende Verdünnung sich herzustellen. Der Nitratgehalt der zu untersuchenden 5 ccm Lösung soll zwischen 3 und 15 γ NO_3–N sich bewegen.

Sonderabdruck aus Liebigs Annalen der Chemie 535. Band (1938).

Zur Kenntnis der stickstoffassimilierenden Bakterien. III.

Über die Nitrit- und Nitrat-Assimilation des Azotobakters;

von *Günther Endres* und *Liese Kaufmann.*

Mit 4 Figuren im Text.

[Aus dem Chemischen Laboratorium der Bayer. Akademie der Wissenschaften zu München und aus dem Chemischen Staatsinstitut der Universität Hamburg.]

(Eingelaufen am 11. März 1938.)

In unserer letzten Arbeit[1]) haben wir berichtet, daß Azotobakter chroococcum die Fähigkeit besitzt, Carboximgruppen zu bilden. Dieser Befund macht es wahrscheinlich, daß bei der Bindung des Luftstickstoffs die >C=NOH-Stufe durchlaufen wird.

Es ist schon lange bekannt, daß nicht nur der molekulare Stickstoff, sondern auch Ammoniumsalze oder Nitrate eine vorzügliche Stickstoffquelle für den Azotobakter darstellen, und daß die Bakterien die Eigenschaft besitzen, in Gegenwart genügender Menge geeigneter Stickstoffverbindungen die Bindung des Luftstickstoffes einzustellen und allein mit Hilfe des gebundenen Stickstoffes ihr Protoplasmaeiweiß aufzubauen. Im Zusammenhang mit unseren Ergebnissen bei der N_2-Fixation schien es uns wichtig, zu prüfen, ob bei der Assimilation von gebundenem Stickstoff ebenfalls Carboximgruppen entstehen.

[1]) A. 518, 109 (1935).

Eine solche Untersuchung über die Assimilation von gebundenem Stickstoff durch Azotobakter bot weiterhin die Möglichkeit, den N-Umsatz quantitativ zu verfolgen und diese Größe in Beziehung zu dem Wachstum, der Atmung usw. zu setzen. Vergleiche dieser Art lassen sich bei der Fixation des Luftstickstoffes nicht durchführen, da die fixierte N_2-Menge in Zeitintervallen, die noch eine biologisch sinnvolle Gegenüberstellung von Ergebnissen parallellaufender Versuche erlaubt, nicht exakt genug zu bestimmen ist. Man ist darauf angewiesen, den komplexen Vorgang der Zellvermehrung als Maß für die N_2-Bindung zu benutzen — unter der Voraussetzung, daß beide Größen auch unter extremen Bedingungen (z. B. p_H-Verschiebung) einen symbaten Gang zeigen.

Aus analytischen Gründen haben wir die Assimilation von NO_2 und NO_3 — beide Ionen lassen sich noch in kleinsten Mengen mit Mikromethoden bestimmen — untersucht. Die Ergebnisse gewähren einen Einblick in die Zusammenhänge zwischen den N-verarbeitenden Enzymen, den Atmungsvorgängen und der Zellvermehrung.

I.

Zur Durchführung der Versuche über die Nitrat- und Nitrit-Assmilation war es erforderlich, neben der Atmung und dem Wachstum gleichzeitig den Verbrauch von gebundenem Stickstoff zu bestimmen und zu bestimmten Zeiten die Bakteriensuspension auf das Vorhandensein von Zwischenprodukten, z. B. freies Hydroxylamin oder Carboximgruppen, zu prüfen.

a) Die Bestimmung der Bakterienatmung erfolgt bei 28° nach der Barcroft-Warburgschen Methode. Zur Verwendung gelangten stets junge ein bis höchstens drei Tage alte Kulturen, deren Züchtung in sterilen Nährlösungen in einer früheren Mitteilung schon beschrieben worden ist. Für die Überlassung von reinen Azotobakterstämmen haben wir Herrn Prof. Boas wiederum sehr zu danken.

b) Um das Wachstum der Bakterien in kurzen Zeitabständen genau und bequem ermitteln zu können, haben

wir eine spezielle Methode ausgearbeitet. Wir bestimmen die Vermehrung der Bakterien während der 4—8-stündigen Versuchsdauer auf optischem Wege, indem wir die mit der Zellteilung einhergehende Zunahme der Trübung quantitativ messen. Dieses Verfahren gestattet, mit nur wenigen ccm Bakteriensuspension auszukommen und die Bestimmung — bezogen auf das Trockengewicht der Bakterien — mit einer Genauigkeit von ± 0,03 mg pro 10 ccm Lösung durchzuführen.

Die Trübung der Bakteriensuspension wird zweckmäßig mit dem Pulfrichschen Stufenphotometer unter Verwendung des Filters S 53 und einer Küvette von 1 cm Schichtdicke ermittelt. Wie aus der folgenden Eichkurve hervorgeht, nimmt die Extinktion bis zu einem Betrage von etwa 1,5 mg Bakterien-Trockengewicht pro 10 ccm proportional dem Trockengewicht zu. Bei höherer Suspensionsdichte steigt die Extinktion langsamer als das Trockengewicht an, was sich in einer Krümmung der Kurve zur Abszisse äußert.

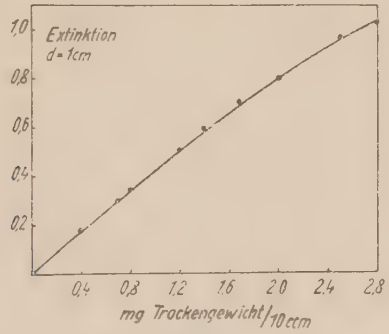


Fig. 1.

Zur Herstellung der Eichkurve wird eine größere bekannte Menge Bakterien-Suspension (etwa 200 ccm), deren Extinktion vorher bestimmt ist, bei 5000 Touren zentrifugiert. Der Bakteriensatz wird, nachdem er einmal mit verdünnter Schwefelsäure, ein zweites Mal mit Wasser gewaschen ist, im Dampftrockenschrank bei 80° zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Fig. 1 gibt die Mittelwerte von zahlreichen Versuchen wieder.

c) Zur Bestimmung der Stickstoffumsätze und der auftretenden N-haltigen Zwischenprodukte war es nötig, spezielle

Mikromethoden auszuarbeiten, über die wir gesondert vor kurzem berichtet haben[1]). Mit Hilfe dieser Verfahren gelingt es, die außerordentlich kleinen N-Umsätze von 0,2—100 γ pro 10 ccm quantitativ zu erfassen.

II.

Gibt man zu Azotobakterkulturen, die ständig durchlüftet werden, *Kaliumnitrit*, so beobachtet man einen Verbrauch der Nitritionen. Diese Nitritreduktion ist ein enzymatischer Prozeß. In Bakteriensuspensionen, die keine C-Quelle enthalten, findet keine Nitritabnahme statt (Tab. 1). Auch unter anaeroben Verhältnissen sind die Zellen nicht imstande, in meßbarer Menge Nitrit zu verarbeiten.

Tabelle 1.

Versuch vom 17. 7. 1936. Lactat-Kultur 2 Tage alt. 400 ccm Kulturlösung zentrifugiert, in 40 ccm äquilibrierte Salzlösung aufgenommen. $t = 28°$. $p_H = 7{,}3$. Alle Ansätze wurden ständig durchlüftet.

Ansatz Nr.	1	2		3	
ccm äquil. Salzlsg.	46,5	37,0		34,5	
ccm Bakt.-Suspension (substratfrei)	—	12,0		12,0	
ccm $^n/_2$-Na-lactat	2,5	—		2,5	
ccm $^n/_{20}$-KNO_2...	1,0	1,0		1,0	
Stunden	γNO_2-N / 10 ccm	γNO_2-N / 10 ccm	cmm O_2 / 10 ccm u. Stunde	γNO_2-N / 10 ccm	cmm O_2 / 10 ccm u. Stunde
0	137	139	10	140	215
2	—	137	6	123	280
4	—	136	3	95	405
6	—	134	3	46	630
8	136	133	6	0	—

Während 8 Stunden ist im Ansatz 1, der nur die Kulturlösungen, keine Bakterien enthält, die Nitrit-Konzentration konstant geblieben. Unter den angewandten Bedingungen ist folglich eine reduzierende Wirkung der organischen Substrate, Glucose und Lactat, nicht nachzuweisen. Im Ansatz 2,

[1]) A. **530**, 184 (1937).

der wohl Bakterien, aber kein Substrat enthält, hat der Nitritgehalt während 8 Stunden nur um 6 γ abgenommen, ein Betrag, der ungefähr der geringen noch vorhandenen Restatmung entspricht. Im kompletten Ansatz 3 sind während 8 Stunden sämtliche zugegebenen 140 γ NO_2' assimiliert worden.

III.

Die NO'_2-Assimilation ist eine Reaktion nullter Ordnung. Die kinetischen Verhältnisse werden durch Fig. 2 veranschaulicht:

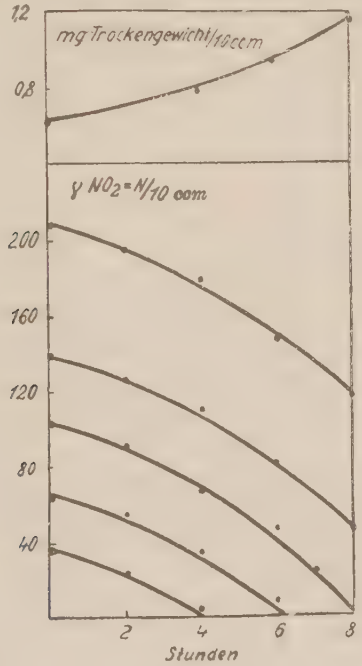


Fig. 2.

Man kann aus dem unteren Bild, in dem auf der Abszisse die Zeit in Stunden, auf der Ordinate die Nitrit-Konzentration eingetragen ist, an dem parallelen Gang der Kurven erkennen, daß die Nitritabnahme in den Kulturlösungen mit stets gleicher Geschwindigkeit vor sich geht, — unabhängig davon, wie groß die ursprüngliche Nitritkonzentration ist.

Aus Fig. 2 ist weiterhin zu entnehmen, daß der NO_2'-Verbrauch mit der Zeit schneller wird. Diese Erscheinung ist durch die zwangsläufig mit der Nitrit-Assimilation gekoppelte Vermehrung der Bakterien bedingt. Die Intensität des Wachstums — die stündliche Trockengewichtszunahme/10 ccm — ist aus dem oberen Bild der Fig. 2 zu ersehen.

Ebenso wie die Nitrit- ist auch die Nitrat-Assimilation ein Vorgang, der unabhängig von der NO_3-Konzentration ist (Tab. 2).

Tabelle 2.

Versuch vom 23. 6. 1937. Lactat-Kultur 2 Tage alt. $t = 28°$.

Stunden	mg Bakterien-Trockengewicht/10 ccm	γ NO_3-N/10 ccm			
0	1,68	98	130	185	372
3	2,04	45	80	132	324
6	2,78	—	19	69	268
γ NO_3-N verbraucht während 6 Stunden:		—	111	116	104

Mit vielen anderen kinetischen Beobachtungen[1]) stimmt die Tatsache, daß die Nitrit- und Nitrat-Assimilation eine Reaktion nullter Ordnung ist, überein. Es ist unter physiologischen Bedingungen beim Azotobakter stets so, daß nicht die Konzentration der Substrate geschwindigkeitsbestimmend ist, sondern daß der Vorgang durch die Aktivität der zelleignen H-Überträgersysteme, gegebenfalls durch die Bildung spezifischer H-Donatoren reguliert wird.

IV.

Bei der Nitrat-Assimilation tritt als Zwischenprodukt stets Nitrit auf. Überraschenderweise ist die Menge des intermediär entstehenden Nitrits von der Natur des Substrates abhängig. In lactathaltigen Kulturlösungen ist die Nitrit-Konzentration um ein Vielfaches größer als in Kulturen, die Glucose als C-Quelle besitzen. Dieser Befund steht in Einklang mit den Beobachtungen über die Bildung der $>C=NOH$-Gruppe während der N_2-Bindung. Auch hier ist in Lactat-Kulturen der Gehalt an Carboxim erheblich höher als in

[1]) A. **512**, 54 (1934).

Glucose-Kulturen. Offenbar wird bei der Lactat-Dehydrierung der normale Prozeß des Eiweißaufbaus in besonderer Weise beeinflußt, was sich in einem Anstauen intermediärer N-Verbindungen äußert.

Ein typisches Bild über das Auftreten von Nitrit bei der Nitrat-Assimilation in Lactat-Kulturen vermittelt die Fig. 3.

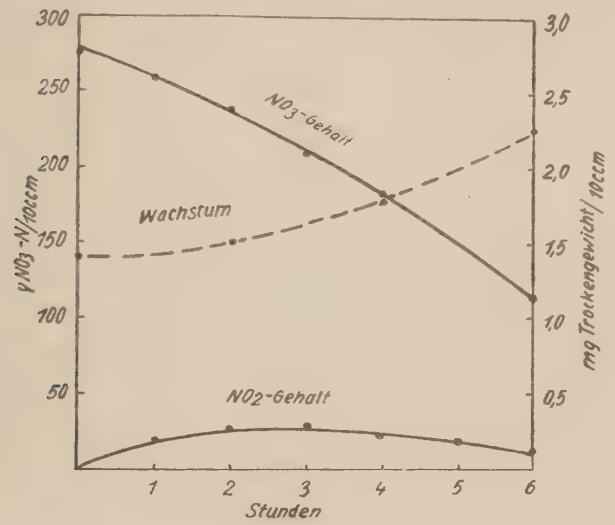


Fig. 3.

Während der Nitratreduktion steigt der Nitritgehalt im Verlauf mehrerer Stunden langsam an, um dann allmählich abzunehmen. Wenn alles Nitrat verbraucht ist, ist auch das Nitrit aus der Lösung verschwunden. Die Nitrit-Konzentration beträgt in Lactat-Kulturen bei $p_H = 7{,}3$ im Durchschnitt je nach Alter der Bakterien 10—40 γ NO_2 - N/10 ccm.

Wir haben festgestellt, daß der NO_2'-Gehalt — der Gehalt an Zwischenprodukt — nur in geringem Maße von der Nitrit-Konzentration abhängt (Tab. 3).

Nach 4 Stunden beträgt in den Versuchen 1 und 3 der NO_2-Gehalt 24 und 16 γ NO_2-N/10 ccm, obwohl die NO_3'-Konzentrationen sich wie 1 : 10 verhalten. Die ziemlich gleichmäßige Höhe des Nitritspiegels ist verständlich, da die NO_3'-Assimilation eine Reaktion nullter Ordnung ist.

Tabelle 3.

Versuch vom 16. 6. 1937. Lactat-Kultur 3 Tage alt. $p_H = 7{,}3$.
Die Zahlen geben an γ N/10 ccm Lösung.

Stunden		Versuchs-Nr.		
		1	2	3
0	γ NO_3-N	383	271	134
	γ NO_2-N	0	0	0
2	γ NO_3-N	330	219	78
	γ NO_2-N	29	25	24
4	γ NO_3-N	270	158	26
	γ NO_2-N	24	21	16
6	γ NO_3-N	205	197	0
	γ NO_2-N	16	13	0

In Glucose-Kulturen beobachtet man während der Nitratreduktion ebenfalls ein Auftreten von Nitrit. Der NO_2'-Gehalt in diesen Lösungen steigt jedoch in den seltensten Fällen über 4γ NO_2-N/10 ccm. Meistens liegt er bei 2 bis 3γ (Tab. 4).

Tabelle 4.

Versuch vom 24. 2. 1937. Glucose-Kultur 1 Tag alt. $p_H = 7{,}2$.

Zeit in Stunden	γ NO_3-N/10 ccm	γ NO_2-N/10 ccm
0	258	0
2	220	3,3
4	162	2,9
6	108	1,7

Bei $p_H = 6{,}4$, in schwachsaurem Gebiet, ist die intermediäre Bildung von Nitrit nicht nur in Glucose- sondern auch in Lactat-Kulturen sehr gering. Wir finden $1—2\gamma$ NO_2-N/10 ccm. Demzufolge ist es durch p_H-Verschiebung möglich, das Auftreten von Zwischenprodukten zu beeinflussen.

V.

Um den Zusammenhang zwischen dem Zellwachstum und der assimilierten Stickstoffmenge kennenzulernen, haben wir in einer größeren Anzahl von Versuchen die Trockengewichtszunahme und den NO_2- bzw. NO_3-Verbrauch genau bestimmt. In lactathaltigen Kulturen beträgt die reduzierte

Nitrit-Menge, die einer Trockengewichtszunahme von 1 mg entspricht, im Mittel 0,15 mg NO_2-N (Tab. 5).

Tabelle 5.

Versuchsdauer: 6—7 Stunden.
Nitritgehalt zu Beginn: 0,15 mg NO_2-N/10 ccm. $t = 28°$. $p_H = 7,2$.

Alter in Tagen (Lactat-Kulturen)	Q_{O_2} d. ersten Stunde ohne Nitrit	mg Trockengewichts-Zunahme/10 ccm	mg NO_2-N verbraucht pro 10 ccm	Nitrit-Verbrauch / Wachstum
1	760	0,39	0,062	0,16
1	550	0,76	0,104	0,14
1,5	470	0,62	0,086	0,14
2	330	0,70	0,088	0,13
2	265	0,72	0,122	0,17

Unabhängig von der Atmungsgröße der Bakterien werden in derselben Zeit, in welcher eine Zellvermehrung um 1 mg stattfindet, 0,13—0,17 mg Nitrit-Stickstoff assimiliert.

Die Koppelung zwischen Wachstum und NO_2'- bzw. NO'_3-Reduktion in Glucose-Kulturen gibt die Tab. 6 wieder. Die Nitrit- und Nitrat-Versuche sind mit der gleichen Kultur ausgeführt worden, so daß die Ergebnisse direkt miteinander verglichen werden können.

Tabelle 6.

Versuchsdauer: 6—7 Stunden. $t = 28°$. $p_H = 7,2$.
I = NO_2-haltige Kulturen, II = NO_3-haltige Kulturen.

Alter in Tagen (Glucose-Kulturen)	Q_{O_2}	mg Trockengew.-Zunahme/10 ccm		Verbraucht mg N/10 ccm		N-Verbrauch / Wachstum	
		I	II	I	II	I	II
1	970	0,80	1,12	0,170	0,154	0,21	0,14
2	465	0,58	0,94	0,143	0,148	0,25	0,15
2	426	0,46	0,74	0,106	0,086	0,23	0,12
2,5	250	0,52	1,00	0,121	0,141	0,23	0,14
3	200	0,48	0,90	0,126	0,145	0,26	0,16

In den NO_3'-Kulturen ist das Wachstum in allen Versuchen lebhafter als in den NO_2'-Kulturen. Das Nitration stellt die bessere N-Quelle für den Azotobakter dar. Daß es auch in viel ökonomischerer Weise Verwendung findet, geht

aus den Zahlen der beiden letzten Spalten der Tab. 6 hervor. Die Bakterien benötigen bei den eingehaltenen Versuchszeiten für eine Zellvermehrung, die einer Trockengewichtszunahme von 1 mg äquivalent ist, durchschnittlich 0,25 mg Nitrit-N, jedoch nur 0,14 mg Nitrat-N. Wenn man bedenkt, daß das Nitrit ein Zwischenprodukt der Nitrat-Assimilation ist, aber trotzdem die NO_2'- und NO_3'-Versuche sich unterscheiden, so sind die Ergebnisse auffällig. Es läßt sich an diesem Beispiel klar machen, daß künstliche Zugabe und zelleigene Bildung eines Zwischenproduktes gesonderte Wirkungen auslösen können.

Die unterschiedlichen und relativ hohen Werte des Quotienten: N-Verbrauch/Wachstum, die von der Natur der N- und C-Quelle beeinflußt werden, weisen darauf hin, daß ein Teil des assimilierten Stickstoffs in Form von Ablagerungsprodukten liegen bleibt und nicht zum Aufbau der Zellsubstanzen Verwendung findet.

VI.

Die Atmung des Azotobakters wird durch Zugabe von Nitrit oder Nitrat in charakteristischer Weise beeinflußt (Fig. 4).

Versuch vom 21. 1. 1938.

Lactat-Kultur $1^1/_2$ Tage alt. $t = 28°$. $p_H = 7{,}2$. 0,14 mg NO_2-N/10 ccm.

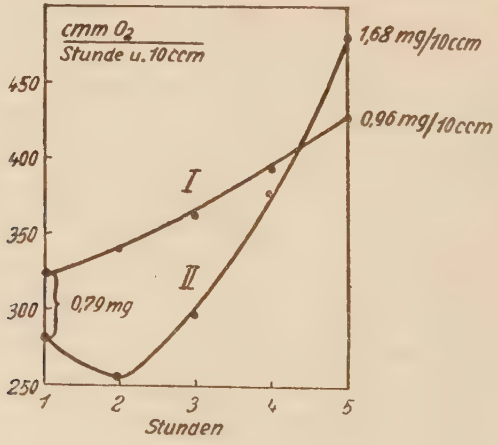


Fig. 4.

Während der stündliche O_2-Verbrauch einer normalen Lactat-Kultur langsam, entsprechend dem Wachstum ansteigt (Kurve I), durchläuft die Kurve II, die die Atmung des Nitrit-haltigen ($^n/_{1000}$) Ansatzes wiedergibt, ein deutlich ausgeprägtes Minimum. In den ersten Stunden nimmt die Hemmung der Atmung zu, in den folgenden Stunden scheinbar schnell ab. Dieser für die NO_2'- und NO_3'-Hemmung typische Gang ist durch das viel stärkere Wachstum der N-haltigen Kulturen bedingt.

Die Wirkung von NO_2' und NO_3' ($^n/_{500}$) in der 2. Stunde auf das Atmungssystem läßt sich aus der Tab. 7 ersehen.

Tabelle 7.

Alter der Kulturen 2 Tage. $t = 28°$.

O_2-Verbrauch der 2. Stunde in Luft $^n/_{500}$-NO_2' bzw. -NO_3'.

		Lactat-Kulturen			Glucose-Kulturen		
		ohne NO_2 und NO_3	NO_2	NO_3	ohne NO_2 und NO_3	NO_2	NO_3
$p_H = 7{,}2$	Q_{O_2}	585	320	340	545	380	470
	% Hemmung	—	45	42	—	30	14
$p_H = 6{,}4$	Q_{O_2}	475	105	385	255	38	230
	% Hemmung	—	78	19	—	85	10

Bei $p_H = 7{,}2$ ist in Glucose-Kulturen die Hemmung der Atmung durch Nitrit größer als durch Nitrat. In Lactat stimmt dagegen der O_2-Verbrauch in den NO_2'- und NO_3'-Versuchen überein. Dies ist verständlich, da in lactathaltigen NO_3'-Ansätzen stets erhebliche Mengen Nitrit angereichert werden (Fig. 3).

Bei $p_H = 6{,}4$ erweist sich Nitrit als ein starkes Zellgift. Die Atmung der NO_3'-Ansätze ist in nur geringem, die der beiden NO_2'-Ansätze in starkem Maße gehemmt. Hieraus folgt, daß bei der Nitrat-Assimilation nur sehr wenig Nitrit als Zwischenprodukt gebildet werden kann. Diese Aussage wird durch die analytischen Ergebnisse bestätigt (vgl. S. 8).

Wir haben uns weiterhin die Frage gestellt, ob die Geschwindigkeit der NO_2'- und NO_3'-Assimilation mit der Atmungsintensität parallel geht. Das ist der Fall (Tab. 8).

Tabelle 8.
Glucose-Kulturen.

Alter der Kultur Tage	cmm O_2 mg Tr.-Gew. u. Stunde	γ NO_2-N mg Tr.-Gew. u. Stunde
$1^1/_4$	560	25,6
2	310	14,7
	Lactat-Kulturen.	
1	460	22
$2^1/_2$	107	5,2

Die Atmungsgröße (Spalte 2), die durch den stündlichen Sauerstoffverbrauch in cmm pro 1 mg Bakterien Trockengewicht definiert ist, nimmt mit zunehmendem Alter der Zelle ab. In der gleichen Weise sinkt auch die NO_2'-Assimilationsgröße. Es ist die von 1 mg Bakterien in der Zeiteinheit reduzierte N-Menge nicht konstant, sondern ebenso wie die Atmung eine Funktion der Zellaktivität.

Die enge Verflechtung zwischen Atmung und NO_2-Assimilation gibt sich ganz besonders klar zu erkennen, wenn man die während 6—7 Stunden assimilierte Nitrit-Menge mit der veratmeten O_2-Menge vergleicht (Tab. 9).

Tabelle 9.
$t = 28°$. $p_H = 7{,}2$. Versuchsdauer meist 6 Stunden. $^n/_{500}$—$^n/_{1000}$-NO_2'.
Q_{O_2} = Atmungsgröße der Kultur vor der NO_2'-Zugabe.
Lactat-Kulturen.

Alter in Tagen	Q_{O_2}	10 ccm Bakterien verbrauchten		Mol NO_2-N / Mol O_2
		ccm O_2	γ NO_2-N	
1	760	1,30	62	0,076
1	470	2,05	86	0,067
2	260	1,89	91	0,077
2	240	1,75	85	0,078
	Glucose-Kulturen.			
1	970	3,48	176	0,080
2	630	2,50	115	0,074
2	465	2,74	143	0,084
3	256	2,86	124	0,069

Die Tab. 9 zeigt, daß das Verhältnis „Mole Nitrit reduziert zu Mole O_2 veratmet“ (Spalte 5) einen konstanten Wert besitzt, der unter den angewandten Versuchsbedingungen im Mittel etwa 0,07 beträgt. Fehlergrenze etwa $\pm$ 0,01.

Für den Quotienten der NO_3'-Assimilation wurde der gleiche Wert ermittelt (Tab. 10).

Tabelle 10.
$t = 28°$. Versuchsdauer 6—7 Stunden.

Alter in Tagen	Q_{O_2}	10 ccm Bakterien verbrauchten		Mol NO_3-N / Mol O_2
		ccm O_2	γ NO_3-N	
1	980	3,55	124	0,056
2	465	3,20	148	0,074
2	390	4,20	198	0,076
3	250	3,30	141	0,068

In derselben Zeit, in der 1 Millimol Sauerstoff veratmet wird, werden 0,07 Millimol NO_3-N assimiliert. Infolge dieser Koppelung kann man aus den Atmungsmessungen den jeweiligen NO_2'- bzw. NO_3'-Verbrauch berechnen[1]).

Der aufgezeigte Zusammenhang zwischen Stickstoff-Assimilation und Atmung ist bemerkenswert und weiterhin für Untersuchungen über die Natur der N-verarbeitenden Enzyme von Bedeutung. Er erschließt nämlich mit Hilfe von Hemmungsversuchen einen Weg, die charakteristischen Unterschiede der beiden Fermentsysteme festzustellen.

Ein Beispiel soll dies klarmachen: Sinkt durch Zugabe eines Stoffes x der Quotient erheblich ab, so folgt daraus, daß die N-Assimilation in viel stärkerem Maße als die Atmung gehemmt worden ist, weiterhin, daß der Stoff x eine besondere Affinität zu den Fermenten des N-Umsatzes besitzt. Versuche dieser Art, die in der nächsten Arbeit beschrieben werden, gewähren ein erstes Eindringen in die enzymatische Eigenart des N-Stoffwechsels.

VII.

Im Einklang mit der N_2-Fixation werden in erwarteter Weise auch bei der NO_2- und NO_3-Assimilation Carboximgruppen gebildet. Wir haben durch viele Versuche sichergestellt, daß die >C=NOH-Gruppe stets in den Nitrit- und Nitrat-haltigen Azotobakter-Kulturen auftritt und sich mit Hilfe der sehr empfindlichen Methode — J_2-Oxydation in der Hitze — nachweisen läßt (Tab. 11).

[1]) Bemerkt sei, daß infolge der ausgeprägten adaptiven Eigenschaften der Bakterien — die Zellen passen sich mit der Zeit der ungewohnten N-Quelle an — der Quotient in den ersten Stunden meist etwas unter der Norm bleibt.

Tabelle 11.

Lactat-Kultur $2^1/_2$ Tage alt. 600 ccm zentrifugiert, aufgenommen in 450 ccm äquilibrierter Salzlösung, die $^m/_{40}$-Lactat enthielt. $t = 28°$. $p_H = 7{,}3$. Mit etwa 65 ccm Gas pro Minute durchlüftet.

Ansatz		Luft		80% Ar + 20% O_2	
		I	II	III	IV
ccm	Bakteriensuspension . .	75	75	75	75
ccm	$^n/_{20}$-KNO_2	—	1,5	—	1,5
	H_2O	5	3,5	5	3,5
9^{30}	cmm O_2/30′ u. 10 ccm	215	115	215	115
	mg Trock./10 ccm . .	1,5	1,5	1,5	1,5
	γ NO_2-N/10 ccm . . .	0	132	0	128
	[Oxim] · 10^{-5}.	0	0	0	0
12^{30}	γ NO_2-N/10 ccm . . .	0	96	0	88
15^{30}	γ NO_2-N/10 ccm . . .	0	23	0	16
16^{30}	γ NO_2-N/10 ccm . . .	0	0	0	0
	γ NO_2OH-N/10 ccm .	0	0	0	0
	cmm O_2/30′ u. 10 ccm	355	465	220	455
	mg Trock./10 ccm . .	1,8	2,2	1,5	2,2
	J_2-Oyd., Farbe	stark rosa	stark rosa	farblos	stark rosa
	[Oxim] · 10^{-5}.	2,0	2,3	0	2,1

In dem Nitrit-freien Ansatz I der Tab. 11 beträgt die Oximkonzentration 2.10^{-5}. Ungefähr denselben Gehalt an >C=NOH besitzt der Nitrit-haltige Ansatz II. Um nun festzustellen, ob die Oxim-Bildung in diesem Ansatz allein durch die NO_2-Verarbeitung verursacht wird und nicht auf die Fixation des Luftstickstoffes zurückgeht, wurden zwei weitere Ansätze (III—IV) statt mit Luft ständig mit einem Gemisch von 80 Proc. Argon und 20 Proc. Sauerstoff durchspült. Da der Nitrit-haltige Ansatz IV wiederum eine Oxim-Konzentration von 2.10^{-5} besitzt, ist der ursächliche Zusammenhang zwischen NO_2-Reduktion und Oxim-Bildung sichergestellt. Im Ansatz III sind keine >C=NOH-Gruppen nachzuweisen, was verständlich ist, da den Bakterien keine N-Quelle — weder N_2 noch NO_2' — zur Verfügung steht.

Das Oxim ist ein Nebenprodukt der NO_3- bzw. NO_2-Assimilation, das durch die Bakterien nur sehr langsam weiter verarbeitet wird. Diesem glücklichen Umstand ist es zuzuschreiben, daß es sich in analytisch erfaßbarer Menge

anreichert. Sein Auftreten zeigt augenscheinlich, daß die Zelle die >C=NOH-Gruppe zu synthetisieren vermag. In dieser Tatsache sehen wir einen Fingerzeig für den Mechanismus der N-Assimilation.

Freies Hydroxylamin tritt in Azotobakter-Kulturen während der N-Verarbeitung nicht auf. Mit den empfindlichsten, speziell ausgearbeiteten Methoden[1]) war es in keiner Phase der Assimilationsvorgänge möglich, Hydroxylamin nachzuweisen. NH_2OH ist in einer Konzentration, die größer als 5.10^{-7} Mol/Liter ist, in den Kulturlösungen nicht vorhanden. Auch während der Bindung des Luftstickstoffs tritt kein Hydroxylamin in die Kulturlösungen über. Dieser Befund steht im Gegensatz zu den ohne experimentelle Belege mitgeteilten Angaben von J. Blom[2]), der glaubt, mit großer Wahrscheinlichkeit ein intermediäres Auftreten von NH_2OH beobachtet zu haben.

Zusammenfassung.

1. Die Assimilation von Nitrit und Nitrat durch Azotobakter ist eine Zellreaktion nullter Ordnung, deren Geschwindigkeit zum Sauerstoffverbrauch der Bakterien in einem konstanten Verhältnis steht. Die Atmungs- und N-Assimilationsgrößen besitzen einen parallelen Gang. Offenbar stehen die Erscheinungen in einem inneren Zusammenhang und lassen sich durch die Vorstellung deuten, daß in bestimmtem Ausmaß — entsprechend der Intensität des oxydativen Stoffwechsels[3]) — spezifische Substrate bereitgestellt werden, die für den Ablauf der N-Reduktion unentbehrlich sind. Hierdurch wird die Koppelung von Atmung und N-Umsatz — die thermodynamisch allein nicht ausreichend zu erklären ist — bewirkt und zugleich verständlich, daß die N-Assimilation ein Vorgang nullter Ordnung darstellt.

2. Der Quotient „N-Verbrauch/Wachstum" hängt von der Natur der C- und N-Quelle ab. Die Zellvermehrung ist nur in Versuchen mit übereinstimmenden Nährstoffen als Maßstab für die N-Assimilation zu verwenden. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, daß nur ein Teil des assimilierten

[1]) A. 530, 184 (1937). [2]) C. Bakt. 84, 60 (1931).
[3]) Wahrscheinlich auch entsprecheud dem O_2-Druck.

Stickstoffs zum Zellaufbau benutzt und stets eine gewisse veränderliche Menge in Form von Zwischen- oder Nebenprodukten ausgeschieden wird. Da das Auftreten solcher N-haltiger Verbindungen von der Natur des organischen Substrats diktiert wird, ist es nicht erstaunlich, daß beispielsweise in Glucose-Kulturen nur in sehr geringer Menge Nitrit und Oxim während der NO_3-Assimilation gebildet werden, während in lactathaltigen Kulturen unter gleichen Bedingungen die Konzentrationen der beiden Produkte um ein Vielfaches größer sind.

3. Während der N_2-Bindung und der NO_3- bzw. NO_2-Assimilation geben die Bakterien Carboximgruppen in die Kulturlösung ab. Ohne Zweifel besitzt die Azotobakterzelle die Fähigkeit, Derivate des Hydroxylamins zu bilden. Im Anschluß an unsere Versuche[1]) hat Virtanen[2]) denselben Befund für das symbiontisch in den Wurzelknöllchen der Leguminosen lebende Bacterium radicicola erhoben. Auf Grund dieser Resultate glauben wir, daß der Weg des Stickstoffs zur Aminosäure sich durch folgende Gleichungen skizzieren läßt:

$$\left.\begin{matrix} NO_3 \rightarrow NO_2 \\ N_2 \end{matrix}\right\rangle > C{=}NOH \rightarrow > C{=}NH \rightarrow > CH{-}NH_2$$

Durch diese Formulierung wird zum Ausdruck gebracht, daß als erster stabiler CN-Körper ein „Oxim" auftritt. Es ist für den angeschriebenen Mechanismus weiterhin charakteristisch, daß die >C=NOH-Konfiguration sich direkt während der Reduktionsvorgänge ausbildet, d. h., daß die Carboximgruppe nicht durch Reaktion von primär gebildetem freiem Hydroxylamin mit Carbonylverbindungen der Zelle entsteht. Die Gleichung stellt das Ergebnis unserer bisherigen Untersuchungen dar. Wenn noch erwähnt wird, daß bei der NH_3-Assimilation wahrscheinlich unmittelbar die Imino-Gruppe entsteht, — daß also die Vereinigung von N und C auch in einer anderen Oxydationsstufe des Stickstoffs erfolgen kann — so ist das Bild von dem chemischen Ablauf der N-Assimilation vervollständigt.

[1]) A. 518, 109 (1935). [2]) Suomen Kemistilehti B. IX, 12 (1936).

Lebenslauf.

Ich wurde als Tochter des Majors i.Gen.St.a.D. Dr. Lukas von Kaufmann und Frau Linda, geb. Kremer in Würzburg am 7.8.1913 geboren. 1918 trat ich in die Volksschule ein. Von Ostern 1923 bis Ostern 1932 besuchte ich das Luisen-Realgymnasium in München und fing nach Ablegung der Reifeprüfung an der Ludwig-Maximilians-Universität im S.S. 1932 an, Chemie zu studieren.

Im S.S. 1934 legte ich dort das erste Verbandsexamen ab. In den Semesterferien arbeitete ich zweimal, 1933 und 1934, in der I.G. Farbenindustrie A.G. in Leverkusen. Nach einem Semester in Berlin kehrte ich wieder nach München zurück und legte im W.S. 1935/1936 das zweite Verbandsexamen ab. Darnach begann ich im Münchener Institut die vorliegende Doktor-Arbeit, die ich durch Versetzung meines Lehrers, Dr. G. E n d r e s , in Hamburg im wissenschaftlichen Laboratorium der Schülke & Mayr A.-G. beendete. Die Arbeit wurde im März 1938 abgeschlossen.